

# 大腸菌における脂肪酸のChain Elongation反応について

著者	西巻 知子
号	149
発行年	1983
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15579">http://hdl.handle.net/10097/15579</a>

氏 名 (本籍)	にし 西	まき 巻	とも 知	こ 子
学 位 の 種 類	薬	学	博	士
学 位 記 番 号	薬 博 第	149	号	
学位授与年月日	昭和 59 年	3 月	27 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 製薬化学専攻			
学 位 論 文 題 目	大腸菌における脂肪酸の Chain Elongation 反応について			

(主 査)

論文審査委員 教授 山 中 宏 教授 南 原 利 夫

教授 鈴 木 康 男

# 論文内容要旨

## は　じ　め　に

生物体の細胞や細胞内小器官を構築する生体膜は、単なる隔壁としての役割りだけではなく、物質輸送や情報伝達、あるいは膜結合酵素の反応の場として重要な役割りを担っている。生体膜の機能発現には膜の流動性が密接に関係しているが、その流動性を調節する主な因子としてリン脂質の脂肪酸組成が挙げられる。*de novo* の生合成系で作られた脂肪酸や食物由来の脂肪酸は、chain elongation 系や不飽和化反応系により膜が必要とする適度の流動性を持つ脂肪酸に変換されて、リン脂質に取り込まれる。

脂肪酸の chain elongation 反応は、既存の acyl-CoA の炭素鎖を 2 から 4 個延長する反応であり、動物組織のミトコンドリアやミクロソーム、さらに一部の微生物に存在することが知られている。動物組織では、リン脂質成分となる長鎖の脂肪酸を供給する上で、必須の役割りを担っている。

脂質代謝制御に関しては、大腸菌を用いての研究が多いが、大腸菌の脂肪酸合成酵素については、構成酵素が解離するいわゆるⅡ型の fatty acid synthetase のみが知られていた。大腸菌の fatty acid synthetase は、動物や酵母に存在する複合酵素のいわゆるⅠ型の fatty acid synthetase とは異なり、モノ不飽和酸を含め、リン脂質構築に必要な脂肪酸を全て合成し、さらに炭素鎖延長による温度適応にも関与するなどいくつかの機能を併有している。また、これまで chain elongation 系は、Ⅰ型の fatty acid synthetase を持つ生物に限って確認されていることもあって、大腸菌の chain elongation 系の存在については、全く関心が払われていなかったといえる。

著者は、不飽和脂肪酸代謝研究の途上で、大腸菌の粗抽出液に chain elongation 系の key enzyme とされている *trans*-2-enoyl-CoA reductase を見い出したことから、大腸菌の chain elongation 反応の研究に着手した。

### 1. *trans*-2-Enoyl-CoA Reductase の存在の証明

最初到大腸菌の粗抽出液に NADPH 依存性 *trans*-2-enoyl-CoA reductase 活性を認めた。続いて、Sephacryl S-200 のゲル濾過により、本酵素が従来知られている fatty acid synthetase に含まれる 2 種類の enoyl-ACP<sup>\*1</sup> reductase、および偶数位にシス二重結合を有する不飽和脂肪酸の  $\beta$ -酸化に関与する *cis*-2-enoyl-CoA reductase や 2,4-dienoyl-CoA reductase とは異なる新たな還元酵素であることを明らかにした。次いで、本酵素の触媒する反応の生成物が対応する飽和酸であることを、その GC-MS 分析により確認した。一方、本酵素は培地に oleic acid などの不飽和脂肪酸を添加することにより誘導されるが、その際、脂肪酸の融点と酵素活性との間に相関があることから、本酵素が膜の流動性維持に関与すること

が推測された。

## 2. *trans*-2-Enoyl-CoA Reductase の精製とその性状

続いて、本酵素の精製を行ない、電気泳動上単一バンドを示す標品を得た。本酵素の分子量はゲル濾過により 80,000、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により 40,000 と決定され、さらに沈降係数 ( $S_{20,w}$ ) が  $4.32 \times 10^{-13}$  であることから、サブユニット 40,000 の二量体として存在するものと推定される。本酵素は、炭素数が 4 から 12 の *trans*-2-enoyl-CoA に作用するがその中で hexenoyl-CoA, octenoyl-CoA に最も高い値を示した。より長鎖の基質にはより低い活性を示したが、その原因は、本酵素が生成物である飽和の acyl-CoA により阻害され、しかも長鎖になるほどその阻害が強まるためと考えられる。また、本酵素は DTNB<sup>\*2</sup> や pHMB<sup>\*3</sup> などにより阻害されるが、NADPH を添加することによりその阻害から保護される。従って、本酵素は NADPH の結合に関与する SH 基を持つことが推定される。

次に、本酵素の立体化学の検討を行ない、本酵素は NADPH の *pro*-4R の水素を基質の 3 位に、また、水溶液中の水素を 2 位に取り込むこと、さらにそれらの水素の絶対配置はどちらも R 型であることを明らかにした。

## 3. 大腸菌の Chain Elongation 系の確認

大腸菌に存在することが確認できた *trans*-2-enoyl-CoA reductase は、動物や *Mycobacterium smegmatis* のそれと同様に、chain elongation 反応に関与していると考えるのが自然である。そこで、初めに大腸菌の resting cell を用い、その菌体中にはほとんど含まれていない中鎖の奇数鎖脂肪酸を前駆体としてインキュベーションを行なった後、菌体のリン脂質画分の構成脂肪酸を調べた結果、chain elongation 生成物と思われる pentadecanoic acid や heptadecanoic acid を検出することができた。

ひき続いて *in vitro* での検討を行なった結果、大腸菌の粗抽出液が  $[1-^{14}\text{C}]$  acetyl-CoA を  $\text{C}_2$  供与体とした acyl-CoA の chain elongation 反応を触媒することが証明できた。本反応は、malonyl-CoA を  $\text{C}_2$  供与体とした際には進行しないこと、また ACP を必要とせず、*de novo* の脂肪酸合成反応を阻害する cerulenin の影響を受けないことから、*de novo* 合成系の fatty acid synthetase 反応とは完全に区別される。

本反応の至適 pH は 5.0 付近であった。pH 5 ~ 7 において NADH は単独で電子供与体となること、また NADPH も pH 5 で NADH の 1/3 程度の作用を示し、酸性側では電子供与体となり得ることが判明した。従って、エノイル還元、3-ケト還元の両反応は共に NADH, NADPH のどちらでも進行することが証明された。炭素数 4 から 16 までの飽和 acyl-CoA の中では、octanoyl-CoA を前駆体とした場合に最大値を示す。Palmitoleoyl-CoA や oleoyl-CoA などの不飽和 acyl-CoA に対する chain elongation 活性は、長鎖の飽和 acyl-CoA に対する場

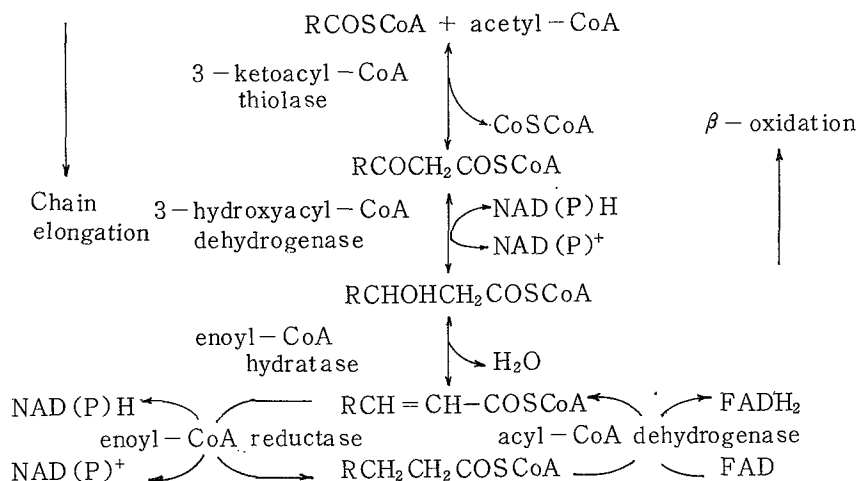
合と同様に低い値を示した。また、反応が  $\text{NEM}^{*4}$  や pHMB で阻害されることから、本反応系に SH-酵素が関与しているものと思われる。

#### 4. Chain elongation 系を構成する酵素

Acetyl-CoA 依存性のミトコンドリアの chain elongation 反応は、 $\beta$ -酸化の逆反応であり、エノイル還元反応の段階で acyl-CoA dehydrogenase の代りに NAD(P)H の還元力を利用する enoyl-CoA reductase が関与すれば、 $\beta$ -酸化の逆反応はエネルギー的にも可能といわれているが、牛心筋ミトコンドリアで 3-ketoacyl-CoA thiolase が chain elongation 反応に関与することが証明されているのみである。

大腸菌の  $\beta$ -酸化系の酵素は、acyl-CoA dehydrogenase を除いて、分子量 260,000 の multienzyme complex を形成していることが報告されている。そこで、この fatty acid oxidation complex をウサギに免疫して調製した特異抗体を使用して、 $\beta$ -酸化の諸酵素の chain elongation 反応への関与を検討した。

まず、fatty acid oxidation complex に対する抗体は、chain elongation 反応を完全に阻害することが判明したが、この結果からは、抗体が縮合、3-ケト還元、脱水の各部分反応のうち、どの反応を阻害したのか、あるいは全てを阻害したのか判別できない。そこで、各反応に対する抗体の作用を個別に検討した。その結果、縮合、3-ケト還元の両反応は抗体によって完全に阻害され、complex 上の酵素のみにより触媒されることが判明した。3-ケト還元反応は NADH、NADPH のどちらを電子供与体とした場合でも同様に阻害されるが、反応の至適 pH は NADH あるいは NADPH の場合で異なっていることから、complex 上に 2 つの活性部位が



Proposed reaction pathways for fatty acid chain elongation and  $\beta$ -oxidation in *E. coli*.

存在する可能性も考えられる。脱水反応に関しては、大腸菌は complex 上の crotonase の他に long chain hydratase の存在が知られており、また用いた酵素画分にも両者が存在することを確認したが、chain elongation 反応への関与については未検討である。最後のエノイル還元反応については、本論文で検討した NADPH 依存性の *trans*-2-enoyl-CoA reductase の他に、NADH 依存性、あるいは NADH と NADPH の両方を電子供与体とするエノイル還元酵素が存在することは確実である。CoA 誘導体にも作用することが知られている NADH 依存性 *trans*-2-enoyl-ACP reductase がその役を担っているか検討する価値がある。

## お わ り に

以上、大腸菌の粗抽出液に *trans*-2-enoyl-CoA reductase を発見したことが端緒となって、大腸菌に acetyl-CoA 依存性の chain elongation 系が存在することを確認した。さらに、本反応系が  $\beta$ -酸化と一部共通の酵素を使用していることを証明することによって、これまで知られていなかった大腸菌の chain elongation 反応の概要を解明することができた。

今後、再構成系や変異株を用いた実験により、大腸菌の脂質代謝における chain elongation 系の位置づけやエネルギー代謝との関連性も検討できるものと考えられる。また、大腸菌の chain elongation 系と、動物ミトコンドリアのそれとは類似点が多いことから、大腸菌の chain elongation 系の詳細を明らかにできれば、解明が難行しているミトコンドリアの chain elongation 系を理解する上で、重要な手掛かりを与えるものと思われる。

- \* 1 ACP = acyl-carrier protein
- \* 2 DTNB = 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
- \* 3 pHMB = *p*-hydroxymercuribenzoic acid
- \* 4 NEM = *N*-ethylmaleimide

## 審 査 結 果 の 要 旨

生体膜の流動性とその機能発現に重要な因子となっているが、その流動性は主として膜を構築しているリン脂質構成脂肪酸に依存している。脂肪酸は食物より供給される他、生体の *de novo* 合成系で生合成される。これらの脂肪酸は、動物では chain elongation や不飽和化反応系で修飾をうけ、最適の流動性をもつ脂肪酸に変換されてリン脂質に取込まれる。一方、大腸菌では *de novo* 合成系で通常の菌体成分となる各種脂肪酸が全て合成されるので、これまで大腸菌に chain elongation 系は存在しないものと考えられていた。

本論文提出者は、不飽和脂肪酸代謝研究の途上で chain elongation 系の key enzyme とされている *trans*-2-enoyl-CoA reductase が大腸菌にも存在することを見出したことから、大腸菌における脂肪酸の chain elongation の有無を検討し、同反応系が大腸菌にも確実に存在することを突きとめた。本論文には次の新知見が記載されている。

1) 大腸菌には NADPH 依存性の *trans*-2-enoyl-CoA reductase が存在し、同酵素は培地への不飽和脂肪酸の添加により誘導される。

2) *trans*-2-enoyl-CoA reductase は最終的にアフィニティークロマトグラフィーを利用することで単離精製できる。電気泳動上単一と認められる試料について、分子量は 40,000 の同じサブユニットから成る二量体が活性型である。基質特異性その他本酵素の一般的性状もこの試料につき明らかとなった。

3) 本酵素の触媒する還元反応の立体化学は、次の通りである。本酵素は NADPH の *pro*-4R の水素を基質である不飽和脂肪酸の 3 位にとり込む。またこの水素および媒質 (水) からとり込まれる水素の配置はどちらも *R* 型であり、付加反応は *anti* 型に進行するものである。

4) resting cell を用いて大腸菌に chain elongation 系が存在することを予試験的に確認したうえで、[1-<sup>14</sup>C] acetyl-CoA および [2-<sup>14</sup>C] malonyl-CoA を用いて *in vitro* で検討すると、中性では NADH のみを、酸性側では NADH の他に NADPH を電子供与体とする acetyl-CoA 依存性の chain elongation 系が存在することが認められる。この知見はラジオガスクロマトグラフィーにより確認されたものである。

5) chain elongation 系を構成する個々の酵素について免疫化学的手法を中心に検討すると、*trans*-2-enoyl-CoA reductase 以外は  $\beta$ -酸化系に作用する酵素が本反応に関与していることを明確に証明できる。

以上の内容から明らかな如く、本論文に示された新知見はいずれも生化学領域で極めて重要なものである。実験技術的にも種々の精密な技術を駆使しており、極めて水準が高い。よって本論文は学位論文としての水準を充分クリアしているものと判断する。